

553 723

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/092366 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/00, A01H 5/00, C12Q 1/68

〒3058602 茨城県つくば市観音台 2-1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005407

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 15 日 (15.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-110682 2003 年 4 月 15 日 (15.04.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人 農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1-2 Ibaraki (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小松田 隆夫 (KOMATSUDA, Takao) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台 2-1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). サイドタバタバエイバドラデン エブラヒム (SAYED-TABATABAEI, Badraddin Ebrahim,) [IR/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台 2-1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP). フェーコンフェン (HE, Congfen) [CN/JP];

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MTEHOD OF DISTINGUISHING EAR SHAPE AND RESISTANCE AGAINST *GIBBERELLA ZEA* AND METHOD OF IMPROVING BARLEY PLANT USING THE SAME

(54) 発明の名称: 穂の形態および赤かび病抵抗性の識別方法とその利用による麦類植物の改良方法

(57) Abstract: Using a cross segregation generation of a 2-row barley variety with a 6-row barley variety, row characteristics of these individuals are exactly judged. As a result, it is found out that the row characteristics show monogenic control. It is also found out that 2-row or 6-row characteristics can be distinguished by using a molecular marker linking to the gene. It is expected that resistance to *Gibberella zea* linking to a 2-row or 6-row gene could be distinguished by using the molecular marker.

(57) 要約: 二条性を示すオオムギ品種と六条性を示すオオムギ品種との交配分離世代を用い、これらの各個体の条性を正確に判定した。その結果、条性は 1 遺伝子支配を示すことが分った。また、該遺伝子と連鎖する分子マーカーを用いることにより、被検麦類植物について六条性または二条性を識別できることを見出した。また、該分子マーカーを用いることにより、二条あるいは六条性遺伝子と連鎖する赤かび病抵抗性を識別できると考えられる。

WO 2004/092366 A1

- 1 -

明細書

穂の形態および赤かび病抵抗性の識別方法とその利用による麦類植物の改良方法

5 技術分野

本発明は麦類の穂の形態及び赤かび病抵抗性を支配する遺伝子を識別する方法に関する。

背景技術

- 10 世界の重要穀物であるイネや、コムギ、オオムギ、トウモロコシなどはいずれもその種子（胚及び胚乳）を食用とする作物である。オオムギでは一つの穂軸に対し3個の一花小穂を形成し、この3個の小穂が全て種子を形成するものを六条オオムギ、中央の1個の小穂のみが種子を形成するものを二条オオムギと総称する。この二条オオムギと六条オオムギは生物学的には同種であるが、起源や来歴をはじめ、各種形態・生理生態的形質が異なり、それによって品質や用途も異なる。
- 15 日本には、はじめに六条オオムギが1世紀頃に大陸から伝来したとされ、昔から米食の補助食料とされ、一部飼料とされた。その他味噌、醤油原料とされる。これに対して二条オオムギは明治以降に欧州から導入され、タンパク質が少なく、でんぷんの比率が高く、麦芽製造過程における揃いが優れており、主にビール醸造
- 20 に利用されている。

- オオムギの条性の違いは第二染色体に座乗する、単一の遺伝子（*vrs1*）で支配されることがわかっている。六条オオムギと二条オオムギの形態を細かく比較すれば、二条オオムギは3個の小穂のうち両側の2小穂でサイズの減少、雄蕊の退化、雌蕊の痕跡化、禾の消失など多くの顕著な変化を示すなど、単一遺伝子が多面的
- 25 発現をしている。また、条性の遺伝子が存在するゲノム領域には開花期、草丈等農業上重要な形質や、醸造諸特性が連鎖しており、きわめて重要な領域である。

- 2 -

また近年、麦類赤かび病に対する抵抗性遺伝子（QTL）がオオムギの条性遺伝子と密接に連鎖することが明らかになった（de la Pena, et al. 1999. Theor. Appl. Genet. 99:561-569、Zhu, et al. 1999. Theor. Appl. Genet. 99:1221-1232）。

麦類の赤かび病はコムギ、オオムギ、エン麦等多くのイネ科作物を侵し、穀粒
5 の商品価値を損なうのみならず、deoxynivalenolなどのマイコトキシンを生じる
重大な病害である。deoxynivalenolは感染穀粒の摂食により人及び動物に対して
出血症をともなう胃腸障害等をもたらし、状況によっては死に至る極めて危険性
の高い毒素である。deoxynivalenolはpHの変化や熱に対して安定であるため無毒
化することが困難である。したがって一定基準を越えた発病穀粒は醸造、加工、
10 飼料等いかなる形態でも利用することが出来ず、廃棄されなければならない。病
原菌はフザリウム（*Fusarium spp.*）であり、これは極ありふれた腐生菌で、世界
中の麦作地帯に分布しており、特に開花期から登熟期に雨の多い地域で被害が大
きいとされている。一方では、食の安全性に対する意識の高まりから農薬の使用
を極力おさえた栽培が求められるようになってきており、抵抗性品種開発は麦類
15 の安全性向上のために不可欠である。以上の課題はアジア地域のみならず、合衆
国や欧州を含めた世界規模で解決すべき緊急の課題となっている。

しかしながら一方で、オオムギ赤かび病の抵抗性向上はそれほど進んでいない。
この原因は、数少ない抵抗性素材が農業上不利な形質を多く併せ持っているため
まだ育種素材として有効利用されていないこと、抵抗性が成熟段階でのみでしか
20 判断できない形質でありマーカーによる早期選抜が不可能であったこと、また、
抵抗性が条性と同じ遺伝子に支配されるのか、あるいは二つの遺伝子が強く連鎖
していて切り離すことが可能か否かが明らかでなく、適切な育種の方針を設定す
ることが出来なかったなどの理由による。このような問題を解決するために、分
子マーカーの開発と早期世代で判別する方法の確立が望まれていた。

25

発明の開示

- 3 -

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、二条あるいは六条性、及び二条あるいは六条性遺伝子と連鎖する赤かび病抵抗性を特異的かつ効率的に識別できる方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った。六条性を示す
5 オオムギ品種「アズマムギ」と二条性を示すオオムギ品種「関東中生ゴール」との交配集団については、既に小松田らにより詳細な連鎖地図が作成され、本条性はオオムギ2H染色体長腕上（連鎖地図（図1）に示す位置）に座乗することが報告されている（Komatsuda, et al. Genome 42, 248-253, 1999）。小松田らにより
既に得られているこれらの連鎖地図上での個々の個体の条性や分子マーカーの分離
10 情報と、ここで得られた連鎖地図上での個々の個体の条性や分子マーカーの分離情報とを合一して、詳細な連鎖地図を作製した（図2）。

本発明者らは、二条性を示すオオムギ品種「関東中生ゴール」の二条性遺伝子を、六条性を示すオオムギ品種「アズマムギ」に導入した準同質遺伝子系統群を作成した（図1）。本発明者らは、これらの準同質遺伝子系統群のうち、二条性
15 をもつと判定した個体より得られたDNAと、六条性をもつと判定した個体より得られたDNAをそれぞれ数個体分あわせて、これらの合一した遺伝子を基に遺伝子多型を見出す集団分離分析方法（Bulk segregation analysis）により、両者に多型を示す分子マーカーを検索するとともに、上記「関東中生ゴール」と「アズマムギ」系統群で見出されたDNAマーカーの適応についても検出したところ、連鎖地図
20 （図2）に示す位置に本遺伝子が座乗し、地図上に示す分子マーカーによって検出できることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち本発明は、麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を特異的かつ効率的に識別できる方法に関し、以下の〔1〕～〔23〕を提供するものである。

〔1〕 麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を識別する方法であって、条性を支配する遺伝子と連鎖する図1および図2の連鎖地図に示される、少なくとも
25 も1つの分子マーカーを用いることを特徴とする識別方法。

- 4 -

〔2〕分子マーカーが二条性あるいは六条性を有する麦類植物と同様の型を示す場合に、被検植物がそれぞれ二条性あるいは六条性であると判定される、〔1〕に記載の方法。

5 〔3〕分子マーカーが赤かび病抵抗性あるいは罹病性を有する麦類植物と同様の型を示す場合に、被検植物がそれぞれ赤かび病抵抗性あるいは罹病性であると判定される、〔1〕に記載の方法。

〔4〕分子マーカーが配列番号：1～5のいずれかに記載の塩基配列またはその部分配列からなる分子マーカーである、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法。

10 〔5〕以下の（a）～（d）に記載の工程を含む、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

（a）麦類植物からDNA試料を調製する工程

（b）調製したDNA試料を制限酵素により切断する工程

（c）DNA断片をその大きさに応じて分離する工程

15 （d）検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

〔6〕以下の（a）～（d）に記載の工程を含む、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

（a）麦類植物からDNA試料を調製する工程

（b）調製したDNA試料を鋳型として、プライマーDNAを用いてPCR反応を行う工程

（c）増幅したDNA断片を、その大きさに応じて分離する工程

（d）検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

〔7〕以下の（a）～（e）に記載の工程を含む、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

25 （a）麦類植物からDNA試料を調製する工程

（b）調製したDNA試料を制限酵素で処理する工程

- 5 -

(c) 処理されたDNA試料を鋳型として、AFLP反応を行う工程

(d) 増幅したDNA断片を、その大きさに応じて分離する工程

(e) 検出されたDNAパターンを、対照と比較する工程

〔8〕 麦類植物がオオムギである、〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法。

5 〔9〕 配列番号：1～5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含有する、麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を識別するための試薬。

10 〔10〕 配列番号：6および7に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含有する、麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を識別するための試薬。

〔11〕 麦類植物がオオムギである、〔9〕または〔10〕に記載の試薬。

〔12〕 〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法により二条性であると識別される麦類植物を早期に選抜する工程を含む、二条性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法。

15 〔13〕 〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法により六条性であると識別される麦類植物を早期に選抜する工程を含む、六条性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法。

20 〔14〕 〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法により赤かび病抵抗性と識別される麦類植物を早期に選抜する工程を含む、赤かび病抵抗性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法。

〔15〕 〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法により赤かび病罹病性と識別される麦類植物を早期に選抜する工程を含む、赤かび病罹病性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法。

25 〔16〕 麦類植物がオオムギである、〔12〕～〔15〕のいずれかに記載の方法。

〔17〕 〔12〕に記載の方法により作製される、二条性の形質を有する麦類植

- 6 -

物。

〔18〕〔13〕に記載の方法により作製される、六条性の形質を有する麦類植物。

5 〔19〕〔14〕に記載の方法により作製される、赤かび病抵抗性の形質を有する麦類植物。

〔20〕〔15〕に記載の方法により作製される、赤かび病罹病性の形質を有する麦類植物。

〔21〕オオムギである、〔17〕～〔20〕のいずれかに記載の麦類植物。

10 〔22〕〔17〕～〔21〕のいずれかに記載の麦類植物の子孫またはクローンである、麦類植物。

〔23〕〔17〕～〔22〕のいずれかに記載の麦類植物の繁殖材料。

本発明は、麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を識別する方法であって、条性を支配する遺伝子と連鎖する図1及び図2の連鎖地図に示される、少なくとも1つの分子マーカーを用いることを特徴とする識別方法を提供する。

15 本発明の識別方法においては、被検植物について「条性を支配する遺伝子」を有するか否かを調べることにより、被検植物の二条あるいは六条性、及び二条あるいは六条性遺伝子と連鎖する赤かび病抵抗性を特異的かつ効率的に識別できる。

本発明に関する「条性を支配する遺伝子」は、例えば、オオムギにおいては、2H染色体長腕上に座乗している。また一般的傾向として、オオムギとコムギ及びライムギでは、祖先を同じくする遺伝子が同祖的染色体上に座乗している。このことから、コムギもしくはライムギにおける条性を支配する遺伝子も第二同祖群に座乗していると予想することができる。なおオオムギの2H染色体に対応する染色体は、コムギでは2A, 2B, 2D、ライムギでは2Rである。

25 本発明における「条性を支配する遺伝子」は、六条性の形質を示す麦類植物の該遺伝子においては、「六条性遺伝子」とも呼ばれ、一方、二条性の形質を示す麦類植物の該遺伝子においては、「二条性遺伝子」とも呼ばれる。

- 7 -

本発明の識別方法においては、二条／六条性を識別したい所望の麦類植物（「被検植物」と記載する場合あり）において、「二条性遺伝子」を有する場合には、被検植物は二条性の形質を有する植物であるものと判定され、一方、「六条性遺伝子」を有する場合に、被検植物は六条性の形質を有する植物であるものと判定される。

本発明の識別方法の好ましい態様においては、条性を支配する遺伝子と連鎖する分子マーカーを用いることを特徴とする。本発明における「分子マーカー」とは、条性を支配する遺伝子と遺伝的に連鎖するDNA領域であって、他のDNA領域と識別可能なDNA領域を言う。本発明において好ましい分子マーカーとしては、図 1 及び図 2 に記載の分子マーカーが例示できる。

一般に分子マーカーは、単位cMで表す地図距離が短いほどその遺伝子の近傍に位置し、その遺伝子と同時に遺伝するため、有用性が高い。即ち、好ましい本発明の分子マーカーとしては、例えばAFLP1(e40m36-1110)（配列番号：1）、AFLP2(e34m13-260)（配列番号：2）、AFLP3(e52m32-270)（配列番号：3）、AFLP4(e31m13-160)（配列番号：4）、AFLP5(e31m26-520)（配列番号：5）、またはこれらの部分領域等が挙げられる。AFLP1からAFLP5は、「条性を支配する遺伝子」（図 1 において「vrs1」と記載された位置に座乗）の近傍に位置し、地図距離が1 cM以内の短い距離で連鎖し、きわめて有用な分子マーカーである。

本発明の図 2 に示される分子マーカーについて、AFLP1からAFLP5以外のマーカーの情報は、より詳しくはKomatsudaらの文献(Komatsuda., et al. Genome 42, 248-253, 1999)及びManoらの文献 (Mano, Y., et al., Map construction of sequence-tagged sites (STSs) in barley (Hordeum vulgare L.) Theor. Appl. Genet. 98: 937-946, 1999) から取得することが可能である。

本発明の好ましい態様においては、例えば、本発明の分子マーカーであるAFLP2(e34m13-260)を持つ六条性品種と、AFLP2(e34m13-260)を持たない二条性品種で分離集団を作ったとき、AFLP2(e34m13-260)を持つ個体をマーカー分析で選抜すれば、

選抜された個体は高い確率で六条性遺伝子を持つものと考えられる。

また、本発明の分子マーカーをAFLPマーカーの状態で利用する場合には、例えば、被検植物（分離個体）が二条性の親と共通の当該のAFLPマーカーバンドを持つと、この植物は高い確率で二条性を有するものと判定される。

- 5 本発明の一つの態様としては、六条性もしくは二条性を有する麦類植物のそれぞれに特異的に存在し、かつ条性を支配する遺伝子と連鎖するDNA領域を検出することを特徴とする、六条性もしくは二条性を有する麦類植物の識別方法である。本方法における被検植物は、通常、親の条性が判明しているものであり、育成途中の系統を指す。本方法においては、例えば、前記の「親」が六条性である場合
- 10 には、被検植物における分子マーカーが「親」における分子マーカーと同様の型を示すとき、被検植物は、六条性を有するものと判定される。被検植物における分子マーカーと「親」における分子マーカーの比較は、分子マーカーのDNA配列の比較だけでなく、該DNA配列によって特徴付けられる情報の比較によっても実施することができる。分子マーカーのDNA配列によって特徴付けられる情報としては、
- 15 分子マーカーの存在の有無についての情報、分子マーカーに含まれる変異部位や多型部位の存在の有無についての情報等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。よって、「同様の型を示す」には、分子マーカーのDNA配列全体が完全に同一である場合だけでなく、該DNA配列によって特徴付けられる情報が同一である場合も含まれる。
- 20 また、本発明の一つの態様においては、図2で示される2つ以上の分子マーカーを適宜選択し、本発明の識別方法を実施することにより、より確度の高い識別が可能となる。

本発明において「分子マーカーを用いる」とは、該分子マーカーを麦類植物の条性または赤かび病抵抗性の識別のための指標として利用することを意味する。

- 25 つまり本発明の好ましい態様においては、被検植物について分子マーカーが六条性の形質を有する麦類植物と同様の型を示す場合に、被検植物は六条性の形質を

- 9 -

有するものと判定され、一方、分子マーカーが二条性の形質を有する麦類植物と同様の型を示す場合に、被検植物は二条性の形質を有するものと判定される。また、被検植物について、分子マーカーが赤かび病抵抗性あるいは罹病性を有する麦類植物と同様の型を示す場合に、被検植物がそれぞれ赤かび病抵抗性あるいは罹病性であると判定される。

本発明において「被検植物」は、麦類植物であれば特に制限されないが、例えば、コムギ、ライムギ等のコムギ連 (*Triticeae*) に属する植物、ブロムグラス牧草等の *Bromeae* 連に属する植物、オートムギ等の *Aveneae* 連に属する植物、その他重要な牧草が多数含まれる *Poeae* 連に属する植物等を挙げることができる。本発明の方法において用いられる好ましい麦類植物としては、オオムギを挙げることができる。

さらに、オオムギの六条性品種としては、例えば、「アズマムギ」や「Dissa」、二条性品種としては、例えば、「関東中生ゴール」や「Golden Promise」を挙げることができるが、これらに限定されない。既に六条性もしくは二条性を有することが判明している上記の麦類植物、または赤かび病抵抗性を有することが判明している上記の麦類植物における分子マーカーの型を対照とすることにより、本発明の識別方法を好適に実施することができる。

また、本発明の好ましい態様においては、「被検植物」は、親が確実に分っている育成途中の系統等を指す。つまり、被検植物において、「二条性」の親と同じ型を示すものが、高い確率で二条性の形質を有する（二条性遺伝子を有する）ものと判定される。この場合の確率とは、組換え価を $P(\%)$ とした場合、 $1-0.01xP$ で表わすことができる。

本発明の分子マーカーとしては例えば RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) マーカー、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカー、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; 増幅制限酵素断片長多型) マーカー等を挙げることができる。RFLP マーカーとは、染色体 DNA 配列の制限酵素断片長多型

- 10 -

(RFLP)の存在の有無の判定に利用できるDNA領域を言う。RFLPとは、制限酵素で処理して得られるDNA断片の長さの違いによって見出される遺伝的変異（置換変異、挿入変異及び欠失変異等）を言い、この変異は、DNA断片をアガロース電気泳動により断片長の長さに基づき分離し、泳動距離の差をサザンブロットにより検出して確認できる。

また、RAPD法とは一般的に、適当なプライマーを用いてDNAを増幅させ、増幅させたDNAの長さの違いによりDNA多型を検出する方法を言う。また、AFLP法とは、原理的には上記のRFLP法とRAPD法を組み合わせた方法であり、制限酵素で切断されたDNA断片の長さの違いや有無をPCRにより選択的に増幅させて検出する方法を言う。

本発明に使用できる上記のマーカーとしては、本発明の遺伝子と連鎖しているマーカーであれば特に制限されず、任意のマーカーを用いることができる。

本発明の分子マーカーとしてRFLPマーカーを利用する場合、本発明の識別方法を、例えば以下のようにして行うことができる。まず、麦類植物からDNA試料を調製する。次いで調製したDNA試料を制限酵素により切断する。次いでDNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで検出されたDNA断片の大きさを対照と比較する。上記方法においては、分離されたDNAの分離パターンが、六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性を有する麦類植物において同様の型を示す場合、該植物はそれぞれ六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性の形質を有すると判定される。

本発明の識別方法はより具体的には以下のように実施することができるが、この方法に限定されるものではない。まず、交配後代（通常は緑葉）から染色体DNAを抽出し、制限酵素HindIIIによって処理する。次いで、電気泳動により切断長の大小を分離した後、泳動したDNAをナイロンメンブレンに移し、プローブDNAを用いてサザンブロッティング解析を行う。このプローブDNAとしては、本発明の分子マーカーまたはその部分配列を使用することができる。このとき得られるバンドの分布パターンが、六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性を有する麦類植

- 11 -

物におけるバンドの分布パターンと同様の型であるとき、被検植物がそれぞれ六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性を有すると判定される。

本発明における上記プローブDNAは、通常、本発明の分子マーカー上の多型に起因して差異を生じるDNAバンドに対してハイブリダイズするものを使用する。具体的には、本発明の各分子マーカーまたはその部分配列を例示することができる。

プローブDNAは、必要に応じて適宜標識して用いることができる。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、プローブDNAの5'端を³²Pでリン酸化することにより標識する方法が挙げられる。また、クレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして、³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）によっても標識することができる。

また、上記のハイブリダイゼーションは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下（例えば、サムブルックら, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版1989に記載の条件）において行うことができる。

また、本発明の分子マーカーとして、RAPDマーカーを使用する場合、本発明の識別方法は例えば以下のようにして行うことができる。まず、麦類植物からDNA試料を調製する。次いで調製したDNA試料を鋳型として、プライマーDNAを用いてPCR反応を行う。必要な場合は増幅したDNAを制限酵素で切断する。増幅したDNA断片の電気泳動後のバンドパターンを六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性を有する麦類植物のバンドパターンと比較し、同様の型を示す場合、該植物はそれぞれ六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性の形質を有すると判定される。

本発明の識別方法に使用するプライマーDNAは、当業者においては、各種分子マーカーについての配列情報を考慮して、最適なプライマーを適宜設計することが可能である。通常、上記プライマーとは、六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性を有する麦類植物に特異的に存在し、条性を支配する遺伝子と連鎖する塩

- 1 2 -

基配列に特異的なプライマー、または六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性を有する麦類植物に特異的に存在し、条性を支配する遺伝子と連鎖する塩基配列を挟み込むように設計された、該塩基配列を増幅するための一対のプライマーセットである。具体的には下記のようなプライマーセットを例示することが出来る。

・プライマー 1 : 5' -ATGGTTGTGTATGTATGGCA-3' (配列番号 : 6)

・プライマー 2 : 5' -CAGAGGTAAGCATTGATTTG-3' (配列番号 : 7)

本発明のPCRプライマーは、当業者においては、例えば、自動オリゴヌクレオチド合成機等を利用して作製することができる。また、当業者においては周知の多型検出方法、例えば、上記PCRプライマーを用いたPCR-SSCP法等によっても本発明の方法を実施することが可能である。

また、本発明の分子マーカーがゲノムDNAのエクソン中に存在する場合には、mRNAを鋳型としたRT-PCRを利用することも可能である。また、Taqman (量的PCR検出) システム (Roche社) を利用すれば、蛍光により増幅産物の有無を検出することが可能である。このシステムによれば、電気泳動の手間も省けるため短時間で本発明の識別方法を行うことが可能である。

さらに本発明の分子マーカーとしてAFLPマーカーを使用する場合、本発明の識別方法は、例えば以下のようにして行うことができる。まず、麦類植物からDNA試料を調製する。次に、このDNA試料を制限酵素で処理した後、処理されたDNA試料を鋳型としてAFLP反応を行う。次いで増幅したDNA断片を、その大きさに応じて分離し、検出されたDNAパターンを対照と比較する。AFLP反応を最適な制限酵素及びPCRプライマーを用いて実施することは、当業者においては、容易に行い得ることである。

本発明の方法の一例を以下に示すが、この方法に限定されない。まず被検植物から調製したDNA試料を制限酵素EcoRI及びMseIで処理した後、所定のAFLPプライマーを接続し、AFLP反応を行い、増幅産物を得る。得られた増幅産物を電気泳動

- 13 -

によって分析し、バンドパターンを六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性を有する麦類植物のバンドパターンと比較し、同様の型を示す場合、該植物はそれぞれ六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性の形質を有すると判定される。

また、本発明の識別方法に供される、DNA試料は、特に制限されるものではないが、通常、被検植物である麦類植物から抽出するゲノムDNAを用いる。また、ゲノムDNAの採取源としては特に限定されるものではなく、植物体のいずれの組織からも抽出できる。例えば、穂、葉、根、茎、種子、胚乳部、フスマ、胚等から抽出することができる。

本発明の上記DNA試料の調製（抽出）方法としては、当業者においては、公知の方法によって行うことができる。好ましい調製方法として、例えば、CTAB法を用いてDNAを抽出する方法を挙げることができる。

さらに本発明の上記電気泳動分析は常法にしたがって行えばよい。例えば、アガロースまたはポリアクリルアミドのゲル中で電圧をかけて電気泳動し、分離したDNAパターンを分析する。

また、本発明の識別方法は、AFLPマーカの実際の配列解析により導き出されるCAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)やSTS(sequence tagged site)マーカなどのより信頼性の高いマーカを用いて実施することも可能である。より具体的には、前述のプライマーセット（プライマー1及び2）を使用して、オオムギ品種「関東中生ゴール」と「アズマムギ」のDNAからPCR反応を行い、生成したそれぞれのDNAを制限酵素DraIで処理すると、「関東中生ゴール」のみがこの制限酵素で一部切断されるために短くなり、電気泳動による移動度に差が生じ、識別することができる。F2分離集団においては両親ホモ型とヘテロ型の3タイプが存在するが、ヘテロ型は両親のサイズを併せ持つタイプを示すことから、この3タイプについて識別可能となる。

本発明はまた、配列番号：1～5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレ

- 14 -

オチドを含有する、麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を識別するための試薬を提供する。

ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合はU）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは当業者に周知のものを使用すればよい。

本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号：1～5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に特異的にハイブリダイズする。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（例えば、サムブルックら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版1989に記載の条件）において、他のDNAとクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないことを意味する。

本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号：1～5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAの検出や増幅に用いるプローブやプライマーとして使用することができる。また、本発明のオリゴヌクレオチドは、DNAアレイの基板の形態で使用するすることができる。

該オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常15bp～100bpであり、好ましくは17bp～30bpである。プライマーは、本発明のDNAまたはその相補鎖の少なくとも一部を増幅しうるものであれば、特に制限されない。また、プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的とし、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。また、配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAの検出や増幅に用いるプライマーセットとしては、前述のプライマーセット（プライマー1及び2）が例示できる。

- 15 -

また、上記オリゴヌクレオチドをプローブとして使用する場合、該プローブは、配列番号：1～5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするものであれば、特に制限されない。該プローブは、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、通常少なくとも15bp以上の鎖長を有する。

本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの5'端を³²Pでリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）を例示することができる。

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖DNA断片として作製することもできる。

本発明の麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を識別するための試薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチド以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

本発明の識別方法を利用して、六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性と識別される麦類植物を早期に選抜することが可能となる。本発明はこのような六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性と識別される麦類植物を早期に選抜する方法も提供する。ここでいう「早期」とは、麦類植物の出穂より前の状態を指し、好ましくは発芽直後の状態を指す。また本発明は、六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法も提供する。

- 16 -

六条性もしくは二条性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法としては、例えば、以下の（a）～（c）の方法を挙げることができるが、これらの方法に特に制限されない。

（a）二条性品種に任意の六条性品種を交配し、交配後代（雑種）に六条性品種を反復して交配し、本発明の方法により各世代で六条性を有する麦類植物を選抜する。もしくは、六条性品種に任意の二条性品種を交配し、交配後代（雑種）に二条性品種を反復して交配し、本発明の方法により各世代で二条性を有する麦類植物を選抜する。

（b）条性を支配する遺伝子が優性遺伝子である品種の遺伝子を、劣性遺伝子を有する品種に導入することにより、条性を改変する。

（c）条性を支配する遺伝子が劣性遺伝子である品種の遺伝子を、優性遺伝子を有する品種に相同組換え法等の方法を用いて導入することにより、条性を改変する。

また、赤かび病抵抗性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法としては、例えば、以下の（a）～（c）の方法を挙げることができるが、これらの方法に特に制限されない。

（a）赤かび病抵抗性品種に任意の赤かび病罹病性品種を交配し、交配後代（雑種）に赤かび病罹病性品種を反復して交配し、本発明の方法により各世代で赤かび病抵抗性を有する麦類植物を選抜する。

（b）赤かび病を支配する遺伝子が優性遺伝子である品種の遺伝子を、劣性遺伝子を有する品種に導入することにより、赤かび病抵抗性を改変する。

（c）赤かび病抵抗性を支配する遺伝子が劣性遺伝子である品種の遺伝子を、優性遺伝子を有する品種に相同組換え法等の方法を用いて導入することにより、赤かび病抵抗性を改変する。

DNAの植物細胞への導入は、当業者においては、公知の方法、例えばアグロバクテリウム法、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、パーティクルガン法に

- 17 -

より実施することができる。

また、本発明の六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法によって作製された、六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性の形質を呈する植物もまた本発明に含まれる。

- 5 一旦、任意の遺伝子が改変された麦類植物が得られれば、該麦類植物から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該麦類植物やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等）を得て、それらを基に該麦類植物を量産することも可能である。

10

図面の簡単な説明

- 図1は、条性を支配する遺伝子(vrs1)と連鎖する分子マーカを示す連鎖地図を示す図である。eで始まる5つのマーカは本発明で作出されたAFLPマーカである。それ以外で始まるマーカは既知のマーカである。連鎖地図中の数字は
15 地図距離(cM)を示す。

- 図2は、アズマムギ／関東中生ゴールのBC6F2並びにBC7F1集団、アズマムギ／Golden Promiseとアズマムギ／Hannaの各F2集団を含む合計6集団による条性連鎖地図を示す図である。AFLP1からAFLP5は今回発明されたAFLPマーカの略称である。それらの完全な名前は表2に示している。それ以外のマーカは既知のマーカ
20 である。

- 図3は、オオムギ品種「アズマムギ」における分子マーカAFLP1およびAFLP2の塩基配列の一例を示す図である。AFLP2における下線部分は、本発明の識別方法に使用可能なPCRプライマーの塩基配列を示す。オオムギ品種「関東中生ゴール」においては二重下線で示した塩基「C」は「A」であり、制限酵素DraIの認識サイ
25 トを構成する。

図4は、オオムギ品種「アズマムギ」における分子マーカAFLP3からAFLP5の

- 18 -

塩基配列の一例を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施
5 例に制限されるものではない。

[実施例 1] アズマムギ／関東中生ゴールのBC6F2並びにBC7F1集団、アズマ
ムギ／Golden Promiseとアズマムギ／Hannaの各F2集団による条性連鎖地図の作製
と分子マーカーの獲得（集団の説明は表 1 に示す）

表 1

集団 ^a	世代	分離個体数	染色体数
アズマムギ x Golden Promise	F ₂	192 及び 914	2212
アズマムギ x 関東中生ゴール ^b		1751	3129
M4-5 x AZ	(BC ₆ F ₂)	(192 及び 908)	(2200)
M1-2, M1-7 及び M2-1	(BC ₆ F ₂)	(278)	(556)
AZ x M1-7, AZ x M2-1	(BC ₇ F ₁)	(373)	(373)
アズマムギ x Hanna	F ₂	192	384
OUH602 x New Golden M13	F ₂	439	878
Debre Zeit 29 x New Golden M13	F ₂	464	928
Dissa x New Golden	F ₂	428	856

^aアズマムギ、Dissa及びNew Golden M13は六条性を示し、それ以外は二条性を示す。

^b条性の遺伝子型同定の便宜のために、準同質遺伝子系統群の植物体を用いて集団
マッピングを行なった。M4-5、M1-2、M1-7、及びM2-1は、アズマムギの反復戻し
15 交配を伴う、アズマムギと関東中生ゴールの交配によって作製された準同質遺伝
子系統群の植物体（個体）である（Komatsuda et al. 1995, 1997, 1999）。M4-5

- 19 -

は二条性の個体にとってホモザイゴートであり、それ以外の3種の植物体はヘテロザイゴートである。

本発明者らは、アズマムギ／関東中生ゴールの反復戻し交配の後代系統BC7F3
 5 (図1、M1-7-64-11-65、あるいはM1-7-64-12-24)をさらに自家受精し、その子孫から二条並びに六条性を有する個体を8個体ずつ選んだ。これらの材料からSDS法により調製したゲノムDNAをEcoRI/MseIを用いて切断した後、非選択プライマー増幅し、条性が同じもの同士を合一し、バルクDNAとした。

本発明者らは、次いで、二条並びに六条性を有する集団のDNAを各種選択プライ
 10 マーセットを用いて増幅するAFLP法を行い、多型を検索し、多型を示すマーカ―を5個見出した(表2)。

表2

コード#	AFLP マーカ―	E-000+/M-000+	概算サイズ(bp)	優性親品種
AFLP1	e40m36-1110	GCT/GAT	1110	アズマムギ
AFLP2	e34m13-260	GAC/ATA	260	アズマムギ
AFLP3	e52m32-270	TAT/CTT	270	アズマムギ
AFLP4	e31m13-160	CTG/ATA	160	アズマムギ
AFLP5	e31m26-520	CTG/CGC	520	アズマムギ

15 本発明者らは、これらのマーカ―と上記の3集団の条性の連鎖関係を解析し、連鎖マップ(図2)を得た。また、判定したこれらの系統の条性形質を、既知のこれらの系統の分子マーカ―情報とあわせ、連鎖関係を解析し、合わせて図2に示した。

以上の結果はオオムギを材料に得られたものであるが、麦類の遺伝子には相同
 20 性があることが知られていることから、オオムギだけでなく、麦類全てで同様の

- 20 -

形質を持っている可能性がある。また、本発明によって赤かび病の抵抗性を付与できる可能性がある。近年、二条性遺伝子は赤かび病の抵抗性向上に有効な遺伝子であるか、あるいは有効な遺伝子と密接に連鎖することが明らかになった。赤かび病は麦類における最も重要な病害であり、赤かび病抵抗性導入のためには分子マーカーの開発と早期世代で判別する方法は有効な手段となりうる。また、二条あるいは六条性遺伝子には赤かび病抵抗性以外にも、醸造諸特性や、開花期、草丈等農業上重要な形質が連鎖しており、本識別手法はこれらの形質すべての効率的選抜に利用できる。

10 産業上の利用の可能性

本発明の麦類の条性に連鎖するDNAマーカーを用いることにより、被検麦類植物についての条性とその穂を観察することなく、幼植物など、被検植物のあらゆる器官から抽出したDNAを用いて正確に判定できる。また、本発明の麦類の条性に連鎖するDNAマーカーを用いることにより、被検麦類植物についての赤かび病抵抗性を識別可能である。本発明により、条性または赤かび病抵抗性に関する判定が育成早期における個体を用いても可能となるため、六条性もしくは二条性または赤かび病抵抗性の形質の遺伝子導入における育種効率が飛躍的に向上する。

- 21 -

請求の範囲

1. 麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を識別する方法であって、条性を支配する遺伝子と連鎖する図1および図2の連鎖地図に示される、少なくとも1
5 つの分子マーカーを用いることを特徴とする識別方法。
2. 分子マーカーが二条性あるいは六条性を有する麦類植物と同様の型を示す場合に、被検植物がそれぞれ二条性あるいは六条性であると判定される、請求項1に記載の方法。
3. 分子マーカーが赤かび病抵抗性あるいは罹病性を有する麦類植物と同様の型
10 を示す場合に、被検植物がそれぞれ赤かび病抵抗性あるいは罹病性であると判定される、請求項1に記載の方法。
4. 分子マーカーが配列番号：1～5のいずれかに記載の塩基配列またはその部分配列からなる分子マーカーである、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
5. 以下の(a)～(d)に記載の工程を含む、請求項1～4のいずれかに記載
15 の方法。
 - (a) 麦類植物からDNA試料を調製する工程
 - (b) 調製したDNA試料を制限酵素により切断する工程
 - (c) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程
 - (d) 検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程
- 20 6. 以下の(a)～(d)に記載の工程を含む、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
 - (a) 麦類植物からDNA試料を調製する工程
 - (b) 調製したDNA試料を鋳型として、プライマーDNAを用いてPCR反応を行う工程
 - 25 (c) 増幅したDNA断片を、その大きさに応じて分離する工程
 - (d) 検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

- 22 -

7. 以下の (a) ~ (e) に記載の工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

(a) 麦類植物からDNA試料を調製する工程

(b) 調製したDNA試料を制限酵素で処理する工程

5 (c) 処理されたDNA試料を鋳型として、AFLP反応を行う工程

(d) 増幅したDNA断片を、その大きさに応じて分離する工程

(e) 検出されたDNAパターンを、対照と比較する工程

8. 麦類植物がオオムギである、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

9. 配列番号：1 ~ 5 のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖
10 に相補的な少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含有する、麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を識別するための試薬。

10. 配列番号：6 および 7 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含有する、麦類植物の条性または赤かび病抵抗性を識別するための試薬。

11. 麦類植物がオオムギである、請求項 9 または 10 に記載の試薬。

15 12. 請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法により二条性であると識別される麦類植物を早期に選抜する工程を含む、二条性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法。

13. 請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法により六条性であると識別される麦類植物を早期に選抜する工程を含む、六条性の形質を有する人為的に改変
20 された麦類植物の作製方法。

14. 請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法により赤かび病抵抗性と識別される麦類植物を早期に選抜する工程を含む、赤かび病抵抗性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法。

15. 請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法により赤かび病罹病性と識別される
25 麦類植物を早期に選抜する工程を含む、赤かび病罹病性の形質を有する人為的に改変された麦類植物の作製方法。

- 23 -

16. 麦類植物がオオムギである、請求項12～15のいずれかに記載の方法。
17. 請求項12に記載の方法により作製される、二条性の形質を有する麦類植物。
18. 請求項13に記載の方法により作製される、六条性の形質を有する麦類植物。
19. 請求項14に記載の方法により作製される、赤かび病抵抗性の形質を有する麦類植物。
20. 請求項15に記載の方法により作製される、赤かび病罹病性の形質を有する麦類植物。
21. オオムギである、請求項17～20のいずれかに記載の麦類植物。
22. 請求項17～21のいずれかに記載の麦類植物の子孫またはクローンである、麦類植物。
23. 請求項17～22のいずれかに記載の麦類植物の繁殖材料。

図 1

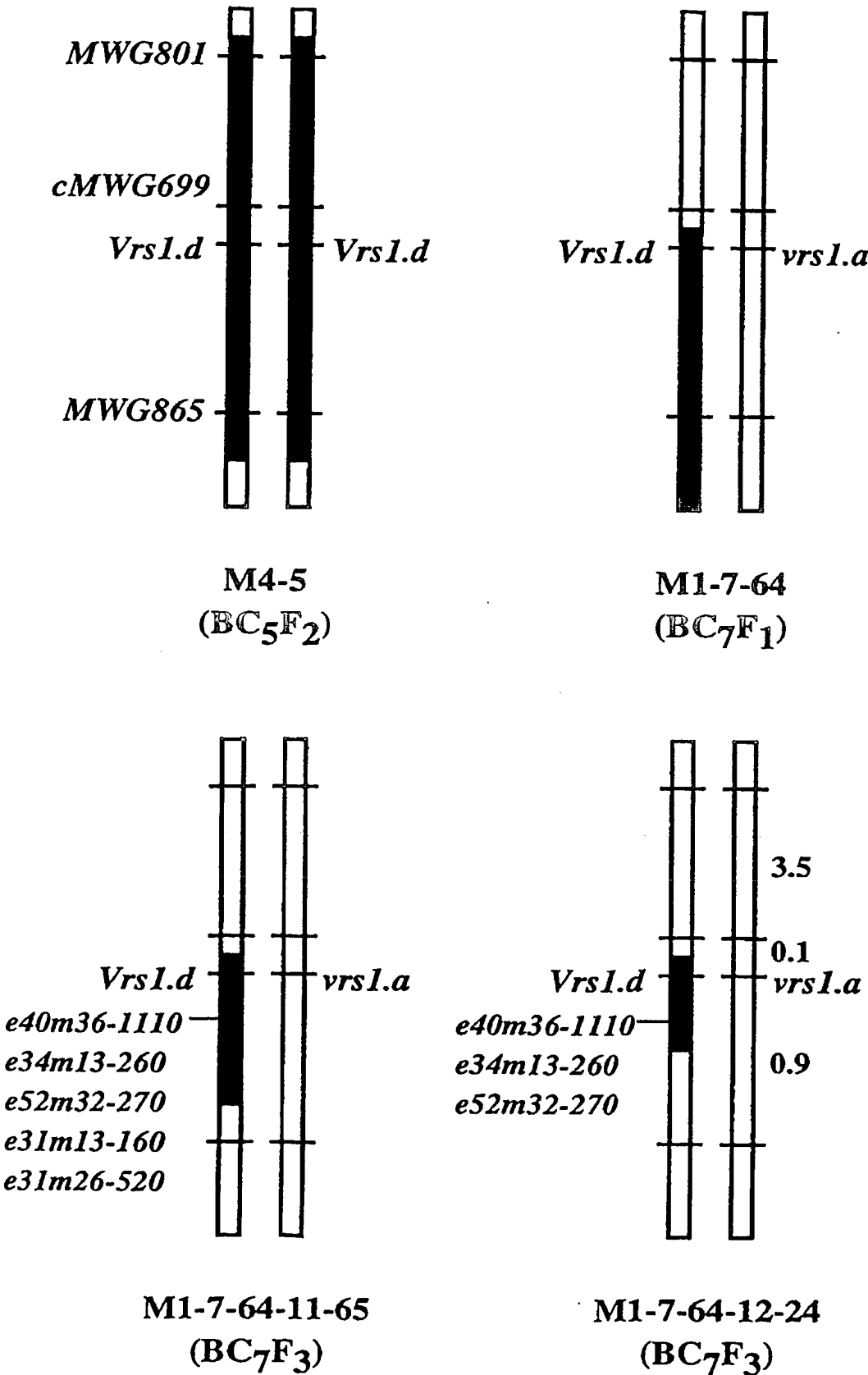


図 2

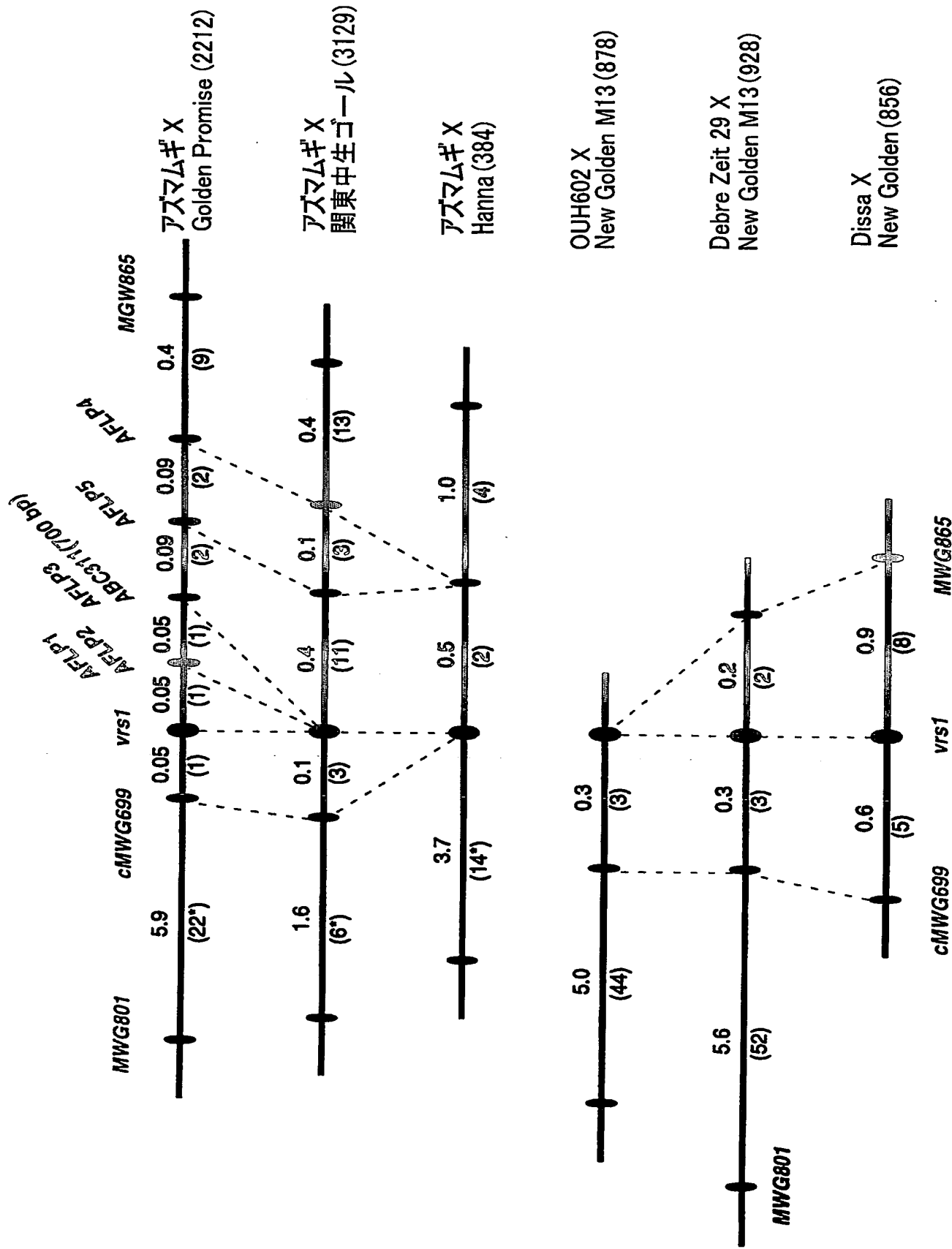


図 3

AFLP1(配列番号 : 1)

GACTGCGTACCAATTCGCTGAGGTA¹CTTGCTCGCATAGTCATGGTGCTCTTTGCAA²ACTGCCAA
GAAGCTCTCGTGCATATAGTATGGGTCGCGGATGCAGATATATTTGATGCTCTCCGTCCTGATG
AAGTAGTTGAGATACAGCGCATACATGCGGATGAACTGGAAATCCA³ACTTGGTCATGTGGAACA
TATTGTAGATGTAGTCAAATCGCAGGAGGAATTGATTGCGGGGCCAGGTATCGAAGTACACCTT
CCCACCCGGGCACCTGAGCCGCGTAAAGCGGGTATCCTGAATCTTTCACGACCAGAAGGCTTTTC
TCTCTGGCCAGCACATCTTCATGGAGTCTCTTTAGATCATTGTTCAGTACGTGATCTATTGTTT
TGGCAGGTAGGATCGGCTTGCCGGCGACATGGAAATGCTTCTTACCTTCGACGGGTATTCTGTC
TACCACCCGGGGTTCCAGAGGCGGCTAGCTGCTTGAAGCATCTATGGCGCCTTTAAGGGCCTTT
CCTGGCCAGTCTCTTCCTTTGCTTCTTGGTGGGTGGCGGTAGTGAACCCACCATACCTTCCCTA
ACCAGCACCCCCAGTGTCA⁴TGCGGGCTAGACAGTGGACGGCCTCGGGGGGTGCTGGCTAGAGGT
GGCATCTCGAGGCGTCTCCTGCGAGGATGGCTTGAAGAGAGACTTTTTGCATTCCACCTTAGGA
CGTTCGCGCTCCGGAAAATCAGGCAACATCAAGTCATCGTCTCCACACTCATAGCCTATTTCTT
CGGCGTCATGAGCCATCAATCCATCATAGGCGGTATTGAAATACTTGTTCCGGGTCTCATCATC
ATCCTCCATGTCATTATCAACATTTGCTTCTTCGACAGTGGGGTGACATGATCTGGCACTAATG
GAGGCTCTCCCTCGCGTTGTACGCTACCATCATCTGCCACGACAGGTGCAAGTAATTTGGTAGG
TGGGATGGTGTTCATACCTTCTTGAGAAGGTGGCGTTGGAGTGATACTGGGCTCCTCGAGACGA
ATAAGAGACTTCGGCCAAGGCAAGAATCAGTTCTTGATGCGCCAATCATCTTACTCAGGACTC
ATC

AFLP2(配列番号 : 2)

GACTGCGTACCAATTCGACTAGCCATGGTTGTGTATGTATGGCACATGGGAGTAAAACGTTACA
ATTCTTTTTGGGAACCACACATAATGAGTATAGCATGGAAGATACTAATAACGTTTGTGTAAC
GTTCACAGTAAAGAACACCACTCAAAATTATATTTCAATCCCGCTTTGAAAACCTTGAGCTCTA
GGACTTGTC⁵CAAATCAATGCTTACCTCTGCAAAGGGTCTATCTATTTACTCAGGACTCATC

図 4

AFLP3(配列番号 : 3)

GACTGCGTACCAATTCTATTAGTGACAATCATGCTAAAAATATGCAAAACCCTAAGCTTGGGGA
TGCTAGTTTTGCTATGACCACTACATGATTGGGGTAATAATTTTTCTTATTGTGACATCCCCGG
ATTTAGGCTACAGTAATCTTGGTAATTGAACTACAGTAAACATATGCAAAGGATGCCACATCAT
CGTGATTCTATTATTGATCTCGTGATAGTCGAAACCGAGTCGAAAATCGAAGTTACTCAGGACT
CATC

AFLP4(配列番号 : 4)

GACTGCGTACCAATTCCTGTGTGGGAAGGGGAAAACCAAAGCCATCATCATCACCAACGCTTCC
TCCTTCGTGGGAGGATCGATCTTCATCAACATATTCACCAGCACCATCTCATGTCCAACCCTAG
TTCATCTCGTGTATTTACTCAGGACTCATC

AFLP5(配列番号 : 5)

GACTGCGTACCAATTCCTGCTGGAGAAAGACGAGGTGCTGGAGGTGGTTGTCCGTGAAGAGCAC
GTTCAGCTTCGTCTAGACGGAGTAGGCACCATCATCATCATGAACCACCGTGTGGAAGAGATCC
TTCGAGATGGTGTGGAAGAATGTCACGCCCAAGATGCGACCCTATCCTCAATTTGGCACGAAGG
CCTTGTGATGGATAGAAGCGCATCTCGTCGTGTCGCAAGAATGGATATCGTTACAAGTACATGT
ACTGAAAAGAAGAGATATATATAGAATTGGCTTACACTCGCCACAAGCTACATCAGAGTCACAT
CAGTACATTACATAATCATCAAGAGCAAGAGCAGGGTCCGACTACGGACGAAAACAAACGATAA
AAATAAGAACAGCGTCCGTCCTTGCTATCCAGGCTGCCGGCCTGGAACCCATCCTAGATCGAT
GAAGAAGAAGAAGAAGCAACTCCAAATGAACAATCAAGGCGCTCGCGTTACTCAGGACTCA
TC

1 / 6

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES

<120> Marker-assisted identification of six/two-rowed and Fusarium head bright resistant plants in the tribe Triticeae.

<130> MOA-A0301P

<150> JP 2003-110682

<151> 2003-04-15

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1091

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 1

gactgcgtac caattcgctg aggtacttgc tcgcatagtc atgggtgctct ttgcaaactg 60

ccaagaagct ctcgtagcata tagtatgggt ccgcgatgca gatatatttg atgctctccg 120

2 / 6

tcctgatgaa gtagttgaga tacagcgcat acatgcggat gaactggaaa tccaacttgg 180

tcatgtggaa catattgtag atgtagtcaa atcgcaggag gaattgattc gcgggccagg 240

tatcgaagta caccttccca ccgggcacct gagccgcgta aagcgggtat cctgaatcct 300

tcacgaccag aaggcttttc tctctggcca gcacatcttc atggagtctc tttagatcat 360

tgttcagtac gtgatctatt gttttggcag gtaggatcgg cttgccggcg acatggaaat 420

gcttcttacc ttgcacgggt attctgtcta ccaccggggg ttccagaggc ggctagctgc 480

ttgaagcatc tatgggcct ttaagggcct ttcttgcca gtctcttcct ttgcttcttg 540

gtgggtggcg gtagtgaacc caccatacct tccctaacca gcacccccag tgtcatcggg 600

ctagacagtg gacggcctcg gggggttgct ggctagaggt ggcatctcga ggcgtctcct 660

gcgaggatgg cttgaagaga gactttttgc attccacctt aggacgttcc ggctccggaa 720

aatcaggcaa catcaagtca tcgtctccac actcatagcc tatttcttcg gcgtcatgag 780

ccatcaatcc atcataggcg gtattgaaat acttgttcgg gtcctcatca tcatcctcca 840

tgtcattatc aacatttgct tcttcgacag tggggtgaca tgatctggca ctaatggagg 900

3 / 6

ctctccctcg cgttgtagc taccatcatc tgccacgaca ggtgcaagta atttggtagg 960

tgggatggtg ttcatacctt cttgagaagg tggcgttgga gtgatactgg gctcctcgag 1020

acgaataaga gacttcggcc aaggcaagaa tcagttcttg catgcgcaa tcattctact 1080

caggactcat c 1091

<210> 2

<211> 253

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

gactgcgtac caattcgact agccatggtt gtgtatgtat ggcacatggg agtaaaacgt 60

tacaattctt ttgggaacc acacataatg agtatagcat ggaagatact aataacgttt 120

gtcgtaacgt tcacagtaaa gaacaccact caaaattata ttttcaatcc cgctttgaaa 180

acttgagctc taggacttgt gcaaataat gcttacctct gcaaagggtc tatctattta 240

ctcaggactc atc 253

4 / 6

<210> 3

<211> 260

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 3

gactgcgtac caattctatt agtgacaatc atgctaaaaa tatgcaaaac cctaagcttg 60

gggatgctag ttttgctatg accactacat gattggggta ataatttttc ttattgtgac 120

atccccggat ttaggctaca gtaatcttgg taattgaact acagtaaaca tatgcaaagg 180

atgccacatc atcgtgattc tattattgat ctcgtgatag tcgaaaccga gtcgaaaatc 240

gaagttactc aggactcatc 260

<210> 4

<211> 158

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 4

gactgcgtac caattcctgt gtgggaaggg gaaaaccaa gccatcatca tcaccaacgc 60

ttctctcttc gtgggaggat cgatcttcat caacatattc accagcacca tctcatgtcc 120

5 / 6

aaccctagtt catctcgtgt atttactcag gactcatc 158

<210> 5

<211> 514

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 5

gactgcgtac caattcctgc tggagaaaga cgagggtgctg gaggtgggtg tcggtgaaga 60

gcacgttcag cttcgtctag acggagtagg caccatcatc atcatgaacc accgtgtcga 120

agagatcctt cgagatgggtg tggaagaatg tcacgcccaa gatgcgaccc tatcctcaat 180

ttggcacgaa ggccttgtca tggatagaag cgcattctcgt cgtgtcgcaa gaatggatat 240

cgttacaagt acatgtactg aaaagaagag atatatatag aattggctta cactcgccac 300

aagctacatc agagtcacat cagtacatta cataatcatc aagagcaaga gcagggtccg 360

actacggacg aaaacaaacg ataaaaataa gaacagcgtc cgtccttgct atcccaggct 420

gccggcctgg aaccatcct agatcgatga agaagaagaa gaagaagcaa ctccaaatga 480

6 / 6

acaatcaagg cgctcgcggtt actcaggact catc

514

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

atggttgtgt atgtatggca

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

cagaggtaag cattgatttg

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005407

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/00, A01H5/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00, A01H5/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS, WPIDS, JSTplus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MESFIN, A et al., Quantitative trait loci for Fusarium head blight resistance in barley detected in a two-rowed by six-rowed population., Crop. Sci., Vol.43, pages 307 to 318 (Jan-Feb 2003)	1-16
X/ Y	TANNO K. et al., A DNA marker closely linked to the vrs1 locus (row-type gene) indicates multiple origins of six-rowed cultivated barley (Hordeum vulgare L.), Theor.Appl.Genet., Vol.104, pages 54 to 60 (2002)	1,2,4-13,16/ 3,14,15
Y	Akira SAITO et al., "Shin Kaihatsu no Seigen Koso Danpencho Tagata (RFLP) Marker o Fukumu Omugi RFLP Chizu", Seibutsu Shigen Kenkyu Seika Joho, No.8, pages 61 to 62 (1999)	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 May, 2004 (12.05.04)Date of mailing of the international search report
25 May, 2004 (25.05.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005407

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MANO, Y. et al., Map construction of sequence-tagged sites (STSs) in barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.), Theor. Appl. Genet., Vol. 98, pages 937 to 946 (1999)	1-16
A	AYOUB M. et al., QTLs affecting kernel size and shape in a two-rowed by six-rowed barley cross., Theor. Appl. Genet., Vol. 105, pages 237 to 247 (2002)	1-16
A	FERNANDEZ, ME et al., The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin., Theor. Appl. Genet., Vol. 104, pages 845 to 851 (2002)	1-16
A	URREA CA et al., Heritability of Fusarium head blight resistance and deoxynivalenol accumulation from barley accession C Iho 4196., Crop. Sci., Vol. 42, pages 1404 to 1408 (2002)	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005407

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005407

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 17-23
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The inventions according to claims 17 to 23 relate to barley plants (propagation materials) specified by a construction method. However, this construction method is specified exclusively by a selection method and thus it is impossible to specify what plants can be (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005407

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

obtained thereby. Accordingly, it is completely unknown what plants (propagation materials) are involved in the scope of the inventions according to claims 17 to 23 and what plants are not.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2004/005407

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 15/00, A01H 5/00, C12Q 1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 15/00, A01H 5/00, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, WPIDS, JSTplus

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	MESFIN, A et al., Quantitative trait loci for Fusarium head blight resistance in barley detected in a two-rowed by six-rowed population. Crop Sci., vol.43, pp.307-318 (Jan-Feb 2003)	1-16
X/ Y	TANNO K et al., A DNA marker closely linked to the vrs1 locus (row-type gene) indicates multiple origins of six-rowed cultivated barley (Hordeum vulgare L.). Theor. Appl. Genet., vol.104, pp.54-60 (2002)	1, 2, 4-13, 16/ 3, 14, 15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.05.2004

国際調査報告の発送日

25.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4N

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	斎藤彰ら, 新開発の制限酵素断片長多型(RFLP)マーカーを含むオオムギRFLP地図. 生物資源研究成果情報, 第8号, 第61-62頁(1999)	1-16
Y	MANO, Y et al., Map construction of sequence-tagged sites(STS) in barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.). Theor. Appl. Genet., vol. 98, pp. 937-946 (1999)	1-16
A	AYOUB M et al., QTLs affecting kernel size and shape in a two-rowed by six-rowed barley cross. Theor. Appl. Genet., vol. 105, pp. 237-247 (2002)	1-16
A	FERNANDEZ, ME et al., The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theor. Appl. Genet., vol. 104, pp. 845-851 (2002)	1-16
A	URREA CA et al., Heritability of Fusarium head blight resistance and deoxynivalenol accumulation from barley accession C Iho 4196. Crop Sci., vol. 42, pp. 1404-1408 (2002)	1-16

第I欄 ニクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 17-23 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲 17-23 に係る発明は作製方法によって特定された麦類植物 (繁殖材料) であるが、当該作製方法は選抜方法しか特定がされておらず、どのような植物が得られるかが特定できない。よって、請求の範囲 17-23 に係る発明にどのような植物 (繁殖材料) が包含され、どのような植物が包含されないのかが全く不明である。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。